



RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA E DOENÇAS
INFECCIOSAS EMERGENTES E REEMERGENTES**

ESTUDO DE HEMOCULTURAS

Arsénio Manuel Mutondo

**LOCAL DO ESTÁGIO: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA DO
HOSPITAL DE SANTA MARIA**

LISBOA/2019



RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA E DOENÇAS
INFECCIOSAS EMERGENTES E REEMERGENTES**

ESTUDO DE HEMOCULTURAS

Arsénio Manuel Mutondo

ORIENTADOR:

Professor Doutor José Gamito Melo Cristino

COORIENTADOR:

Dra. Maria Luís de Almeida de Bragança Fernandes

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	9
1.1	Contexto do problema	9
1.2	Descrição do local do estágio	9
1.3	Fisiologia do sangue.....	10
2	Hemocultura	11
2.1	Sépsis	12
2.2	Pneumonia grave	12
2.3	Prevenção da pneumonia	13
2.4	Meningite	14
2.5	Etiologia da Meningite	14
3	Características gerais das bactérias	14
3.1	Principais bactérias causadoras de infecção no sangue	15
3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.3	Doenças causadas por invasão e lesão dos tecidos por <i>S. aureus</i>	17
3.4	Doenças resultantes por acção de toxinas por <i>S. aureus</i>	17
3.5	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo.....	18
3.6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19
3.7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
3.8	<i>Streptococcus</i> do grupo B	20
3.9	Manifestações clínicas. <i>S. agalactiae</i>	21
3.10	<i>Escherichia coli</i>	22
3.11	<i>Klebsiella spp.</i>	23
3.12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
4	Métodos automatizados usados para o processamento das hemoculturas	24
4.1	Vantagem dos equipamentos automatizados	25
4.2	Desvantagem dos métodos automatizados	25

Ilustração 2. Equipamento para detecção de microrganismos em garrafas de hemoculturas - BacT/ALERT VIRTUO®	26
4.3 Método automático para coloração de Gram (Aerospray®)	27
4.4 MALDI-TOF	Erro! Marcador não definido.
4.5 MicroScan WalkAway e Vitek 2 Compact®	29
II. OBJECTIVOS	32
III. RELATÓRIO DO ESTÁGIO	33
3.1 Fase pré – analítica	33
3.2 Técnicas de colheita da amostra para hemoculturas	33
3.3 Fase analítica.....	34
3.4 Procedimentos para o BACTEC 9000®	34
3.5 Procedimentos para o Bact/ALERT VIRTUO®	34
3.6 Procedimentos para o Bact/ALERT MB®	35
5 Hemoculturas positivas	35
5.1 Coloração pelo método de Gram	35
5.2 Técnica automatizada para coloração de Gram.....	35
5.3 Técnica manual de coloração de Gram	36
5.4 Técnica para sementeira	37
5.5 Sementeira primária	38
5.6 Hemoculturas em aerobiose das 4 horas	39
6 Orientação para as hemoculturas	39
6.1 Observação das hemoculturas de 24 horas	39
6.2 Provas de coagulase:	41
6.3 Prova de coagulase em tubo	41
6.4 Prova de coagulase em lâmina.....	42
6.5 Prova de Optoquina.....	43
6.6 Teste de Catalase	44

6.7	Exame directo a fresco de Fungos.....	46
6.8	Prova de filamentação em lâmina	47
6.9	Prova da oxidase.....	49
6.10	Orientação de falsos positivos	50
7	Sistemas automatizados para identificação de microrganismos e antibiograma.....	50
7.1	Técnica para identificação de microrganismos utilizando MALDI-TOF.....	50
7.2	Técnica para identificação e antibiograma utilizando VITECK 2 Compact®	51
7.3	Técnica para identificação e antibiograma utilizando MicroScan <i>WalkAway 96 Plus</i> 52	
7.4	Antibiograma por método manual (Método de Kirby-Bauer)	53
IV.	Controlo de qualidade de Hemocultura no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Santa Maria.....	55
V.	CONCLUSÃO	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipamento para detecção de microrganismo em frasco de hemoculturas - BacT/ALERT VIRTUO®	26
Figura 2. Equipamento para detecção de microrganismos em frascos de hemoculturas - Bact/ALERT 3D®	26
Figura 3. Equipamento para detecção de microrganismos - BACTEC 9000®... Erro! Marcador não definido.	
Figura 4. Equipamento para coloração automática de Gram - Aerospray® Gram.....	29
Figura 5. Equipamento para identificação de microrganismos – MALDI-TOF	29
Figura 6. Equipamento automatizado para identificação de microrganismos e antibiograma: A MicroScan – WalkAway 96 plus. B Dispensador MicroScan. C Painel MicroScan	30
Figura 7. Equipamento para identificação e antibiograma: A Vitek 2 Compact®. B. C. Carta para antibiograma	31

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Sementeira primária.....	38
Tabela 2. Novas passagens de hemoculturas.....	39
Tabela 3. Orientação para estudos de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos	40
Tabela 4. Orientação para estudo de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Tabela 5. Orientação para estudo de <i>Streptococcus</i> spp.....	43
Tabela 6. Orientação para estudos de <i>Streptococcus/Enterococcus</i> spp.	45
Tabela 7. Orientação para estudos de Fungos	46

AGRADECIMENTOS

O presente relatório final de estágio de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o preciso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer aos meus orientadores; Dra. Maria Luís de Bragança Fernandes e Professor Doutor José Gamito Melo Cristino, muito obrigado por toda paciência, empenho e sentido prático que sempre tiveram em me orientar na fase do estágio, assim como na fase final da entrega deste relatório final de estágio.

Desejo igualmente agradecer a todos os professores do curso do Mestrado em Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas Emergentes, da Faculdade de Medicina de Lisboa, em especial a Prof.^a Emília Valadas, Prof. Mário Ramirez, Doutor Thomas Hanscheid. Muito obrigado pelos ensinamentos e apoio que me deram ao longo desta formação.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia Clínica, do Hospital de Santa Maria, em especial os técnicos; o Sr. Rui, a Sr.^a Dulce, Sr.^a Fátima e a Amélia. Muito obrigada pela disponibilidade e dedicação que sempre tiveram em me ensinar as técnicas utilizadas em Laboratórios de Microbiologia.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Formação Avançada (IFA) da Faculdade de Medicina de Lisboa, pelo amor e carinho que sempre tiveram por mim.

Aos meus colegas do curso de mestrado, em especial a Lúcia e a Carolina, obrigado pelo apoio incondicional que me deram ao longo da formação.

Por último, quero agradecer aos meus familiares e amigos pelo apoio incondicional que me deram especialmente aos meus pais; Gonçalves Mutondo e Benita Manuel, os meus irmãos; Raul, Veríssimo, Esperança, Domingos, Fernando e Alice; a minha esposa, Luciana e os meus filhos; Leandro, Príncipe e Eufraçina; cujo amor, carinho e amizade estiveram sempre presentes em todos os momentos.

Obrigado a todos

RESUMO

A hemocultura é um exame que se baseia na determinação de microrganismos na corrente sanguínea de doentes com suspeita de um quadro infeccioso como: febre de origem desconhecida, sépsis, endocardite, pneumonia, meningite, infecções em doentes imunodeprimidos e bacteremia. As infecções da corrente sanguínea são causadas principalmente por: bactérias, vírus e fungos. As principais bactérias que causam infecções da corrente sanguínea são: *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus*, Bacilos Gram-negativo e Bacilos Gram-negativo não fermentadores. Numa hemocultura, recomenda-se que se colhe pelo menos 2 (duas) amostras de 10 ou 20 ml de sangue do doente, em punções diferentes antes do início da antibioticoterapia, utilizando técnicas antisépticas: (desinfectar o local da punção com algodão embebido em solução alcoólica de iodo povidona ou álcool iodado). O sangue colhido é inoculado em 2 (dois) frascos; (anaeróbio e aeróbio) para maior clareza dos resultados. As amostras e as requisições dos doentes, quando chegam ao Laboratório, são devidamente identificadas e posteriormente são incubadas em equipamentos automatizados: (Bact/ALERT VIRTUO, Bact/ALERT 3D e BACTEC 9000). Estes equipamentos dão alarme sempre que houver garrafas de hemoculturas positivas. Os frascos de hemoculturas positivos são removidos dos equipamentos, em seguida faz-se a sementeira e a coloração pelo método de Gram. Os resultados da sementeira e do método de Gram são analisados na sala das informações e posteriormente são encaminhados para a sala de identificação e antibiograma. Onde as hemoculturas menos sugestivas, faz-se apenas identificação da espécie bacteriana e as mais sugestivas, faz-se identificação da espécie bacteriana e antibiograma, utilizando os seguintes equipamentos: MALDI-TOF, Microscan WalkAway e Vitek 2 Compact[®]. Os resultados da sementeira, do método de Gram, da identificação da espécie bacteriana e do antibiograma; são enviados com maior brevidade ao Clínico para dar início a terapêutica específica aos doentes.

ABSTRACT

Blood culture is an examination that is based on the determination of microorganisms in the bloodstream of patients suspected of an infectious condition such as: fever of unknown origin, sepsis, endocarditis, pneumonia, meningitis, infections in immunosuppressed patients and bacteremia. Bloodstream infections are mainly caused by: bacteria, viruses and fungi. The main bacteria that cause bloodstream infections are: *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus*, Gram-negative Bacilli and Gram-negative Bacilli non-fermenters. In a blood culture, it is recommended that at least 2 (two) samples of 10 or 20 ml of patient blood be harvested in different punctures before initiation of antibiotic therapy, using antiseptic techniques: (disinfect the puncture site with cotton soaked in alcoholic solution of povidone iodine or iodado alcohol). The blood collected is inoculated in 2 (two) vials; (anaerobic and aerobic) for greater clarity of the results. Patient samples and requests, when they arrive at the Laboratory, are properly identified and are subsequently incubated in automated equipment: (Bact/ALERT VIRTUO, Bact/ALERT 3D and BACTEC 9000). These equipments give alarm whenever there are bottles of positive blood cultures. Positive blood culture vials are removed from the equipment, then sowing and staining by gram method are made. The results of the sowing and gram method are analyzed in the information room and are subsequently forwarded to the identification room and antibiogram. Where less suggestive blood cultures are made, it is only identified bacterial species and the most suggestive; it is identified by the bacterial species and antibiogram, using the following equipment: MALDI-TOF, Microscan WalkAway and Vitek 2 Compact®. The results of sowing, Gram method, identification of bacterial species and antibiogram; are sent more quickly to the Clinician to initiate specific therapy to patients.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Contexto do problema

A escolha do tema tem como base a experiência de como são feitos os exames microbiológicos de hemoculturas, desde a manipulação dos equipamentos até às tecnologias usadas para o diagnóstico de doenças infecciosas no Hospital Santa Maria (HSM).

O estágio, no Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do (HSM) teve uma duração de 8 (oito) meses. Utilizaram-se amostras de sangue humano, obtidas nos serviços Clínicos do Centro Hospitalar Lisboa Norte EPE (CHLN), colhidas após a requisição do médico.

Foi um estágio observacional; onde observei a aquisição das amostras e o manuseamento dos equipamentos do (LPC), para estudos de hemoculturas. O objetivo é que num futuro próximo eu possa aplicar estes conhecimentos nos hospitais de Angola, em particular na província do Moxico e, assim, contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos cidadãos.

1.2 Descrição do local do estágio

O presente relatório refere-se ao estágio realizado LPC do HSM, desde 1 de Fevereiro de 2019 até 22 de Julho de 2019, no âmbito do Mestrado em Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas Emergentes, da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL).

O HSM é um Hospital Universitário, que integra o (CHLN), que por sua vez pertence ao serviço Nacional de Saúde (SNS). O HSM está localizado na cidade universitária, na junta de freguesia de Alvalade em Lisboa.

O LPC está localizado no 4º piso, elevador nº 6 do HSM; é constituído por uma área que corresponde à secretaria, sala de reuniões, refeitório e gabinetes e por outra área que integra os Laboratórios (as salas de trabalho laboratorial). Os diferentes laboratórios que constituem o LPC são: Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Hematologia, Laboratório de Química Clínica, Laboratório de Serologia Viral, Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Urgência; espalhados pelos pisos 1,3 e 4 do HSM.

A secção de hemoculturas encontra-se integrada no laboratório de Microbiologia; é constituída por uma área de equipamentos para a incubação e deteção de microrganismos em frascos de hemoculturas, sala de informações, estufa, sala de identificação e antibiograma.

Os recursos humanos no LPC são constituídos por 8 médicos, 15 técnicos de diagnóstico e terapêutica e 2 técnicos superiores, o que faz um total de 25 profissionais efetivos neste laboratório.

1.3 Fisiologia do sangue

O sistema circulatório é constituído principalmente pelo coração e pelos vasos sanguíneos capilares. O sangue é um líquido, de cor vermelha que assegura o equilíbrio necessário para a sobrevivência das células. Flui pelos vasos sanguíneos onde constitui as vias de comunicação, através das quais o sangue chega a todas as células, levando materiais alimentícios necessários às diferentes partes do corpo e delas traz resíduos.^[1] Por meio dele, os tecidos recebem oxigénio que provém dos pulmões, transporta nutrientes provenientes da digestão para todo organismo, hormonas e substâncias para neutralizar os venenos. O sangue também conduz calor, da parte do corpo onde é produzido, a todas as partes do corpo. Os resíduos eliminados pelos tecidos são levados pelo sangue aos rins, o dióxido de carbono é conduzido aos pulmões, onde será eliminado. Os principais tipos de vasos sanguíneos são: os capilares, as artérias e as veias.^[1,2]

O processo de produção, desenvolvimento e diferenciação das células do sangue é denominado hematopoiese. As células do sangue são produzidas a partir da medula óssea em adultos e em desenvolvimento fetal a partir do saco vitelino, fígado e baço.^[1]

A medula óssea produz cerca de 3 milhares de milhão de glóbulos vermelhos, 1,5 milhares de milhão de glóbulos brancos e 2,5 milhares de plaquetas, por quilo de peso, por dia.^[1]

O sangue transporta as células do sangue, nutrientes e resíduos através dos vasos sanguíneos, no qual há 3 (três) tipos de células, cada uma com função específica; **Eritrócitos ou glóbulos vermelhos, Leucócitos ou glóbulos brancos e Plaquetas:**^[2]

- **Eritrócitos ou glóbulos vermelhos;** realizam a respiração celular, ao transportar oxigénio e dióxido de carbono pela hemoglobina;
- **Leucócitos ou glóbulos brancos;** incluem diferentes tipos de células: neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos; cada célula tem uma função específica no mecanismo de combate aos agentes patogénicos;
- **Plaquetas;** proporcionam a coagulação do sangue, quando necessário, a fim de não se perder sangue em demasia, sempre que é lesado um vaso sanguíneo;

2 Hemocultura

O sangue é um líquido estéril, contudo vários microrganismos podem invadir a corrente sanguínea sem causar danos. Mas, quando há uma falha no sistema imunológico do indivíduo, pode ocorrer uma proliferação de microrganismos, podendo dar origem a sépsis. O exame adequado, em laboratório de microbiologia, para a determinação de agentes patogénicos na corrente sanguínea, é a hemocultura. ^[3]

A hemocultura é uma determinação analítica, na qual são usadas amostras de sangue de doentes, através do uso de meio de cultura específico que nos permite determinar a presença de agentes patogénicos na corrente sanguínea do doente. ^[4]

Numa hemocultura, o sangue colhido ao doente é inoculado em dois frascos para maior clareza nos resultados. Um frasco aeróbio e outro anaeróbio, contendo meios de cultura que permitem o crescimento de microrganismos, para determinar se existem agente patogénicos na corrente sanguínea do doente. ^[4]

As hemoculturas fazem-se quando há suspeita de quadro infeccioso como: febre de origem desconhecida, sépsis, endocardite, infecção em doentes imunodeprimidos, pneumonia grave, meningite e bacteremia⁴. Para o exame de hemocultura, devem ser coletadas pelo menos, duas punções venosas de 10 a 30 ml de sangue, em adultos, e inoculados em dois frascos (aerobiose e anaerobiose), de preferência antes do início da antibioticoterapia ou desde que seja obedecida a urgência médica. A colheita das amostras não deve ser realizada no momento do pico febril. ^[5,6]

2.1 Sépsis

A sépsis pode ser definida como um síndrome caracterizado pela resposta inflamatória do organismo a uma infecção. [7, 5, 8] Normalmente, a sépsis ocorre quando as bactérias circulantes na corrente sanguínea se multiplicam a uma taxa que excede a sua remoção pelos fagócitos. [7] As manifestações clínicas de doentes com sépsis variam desde: confusão ou desorientação, hiperventilação, febre, calafrios, taquicardia, dor ou mal-estar, pele suada e toxidade ou prostração [7].

Os sintomas da sépsis são produzidos por toxinas sintetizadas pelos agentes infecciosos ou por citocinas produzidas por células inflamatórias¹². Nestes últimos tempos têm-se verificado que, as bactérias Gram-positivas, (por ex. *Staphylococcus coagulase-negativos*, assim como *S. aureus*), têm uma grande importância etiológica na infecção. Os fungos estão representados com maior realce, pelo género *Candida*, sendo importantes agentes causadores de sépsis. [9]

Os centros de Controlo e Prevenção de Doenças, (CDC) lançaram o projeto; “fique à frente da sépsis” (do inglês, “**Get ahead of sepsis**”): Uma iniciativa educacional que visa proteger os americanos dos efeitos devastadores da sépsis. Este projecto transmite informações sobre a importância do reconhecimento precoce e do tratamento oportuno da sépsis, bem como a importância de prevenir infecções que poderiam levar à sépsis. [7]

Sobre o projeto de “fique à frente da sépsis”, foram traçados os seguintes pressupostos: [7]

- Estudar os factores de riscos para a sépsis;
- Ajudar os profissionais de saúde, os doentes e suas famílias a reconhecer os sinais de sépsis;
- Incentivar a prevenção de infeções por meios de programas de incentivação, manejo de doenças crónicas e uso apropriado de antibióticos.

2.2 Pneumonia grave

A pneumonia é a inflamação dos pulmões que afecta os alvéolos pulmonares, pequenos sacos responsáveis pela passagem do oxigénio dos pulmões para o sangue, que em pessoas saudáveis se enchem de oxigénio. Já em pessoas doentes com pneumonia, os alvéolos

são preenchidos com pus e líquidos, o que torna a respiração dolorosa e limita a absorção de oxigénio. [10, 11]

A pneumonia continua a ser a principal causa de mortalidade infantil no mundo. Estima-se que a pneumonia tenha causado a morte de cerca de 920 136 crianças com menos de 5 anos de idade em 2015, o que representa 15% de todas as mortes infantis em menores de 5 anos de idade em todo mundo. [10, 12] A sua prevalência é maior em África Subsaariana e no sul da Ásia. [10]

O *S. pneumoniae* é a causa mais comum de pneumonia nosocomial nas enfermarias gerais dos hospitais, nas unidades de cuidados intensivos e em lares da 3ª idade. [32]

Os principais microrganismos que causam pneumonia são: *S. pneumoniae*, Vírus sincicial respiratório, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e *Pneumocystis jiroveci*. [10, 11]

Os mecanismos de transmissão da pneumonia são: [10, 11]

- Para que alguém desenvolva a pneumonia é preciso que fungos, vírus ou bactérias, presentes na cavidade nasal ou na orofaringe do indivíduo, possam chegar até aos alvéolos e infectá-los, quando são inalados;
- Pode ser transmitida, também, pelo ar após contacto com secreções de pessoas contaminadas;
- Isto acontece quando o agente infeccioso é altamente virulento e quando há uma falha no sistema imunológico do indivíduo;

2.3 Prevenção da pneumonia

A prevenção é o principal mecanismo para a redução da taxa de mortalidade causada pela pneumonia infantil. A imunização contra *Haemophilus Influeza* b (Hib), pneumococo, sarampo, coqueluche é a forma mais viável para prevenir a pneumonia. [10, 13]

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) lançam estratégias que visam à redução da elevada taxa de mortalidade infantil causada pela pneumonia, ao criar o Plano Global de Ação para a prevenção e Controlo da Pneumonia (GAPP), na qual recomendam urgentemente a aplicação de metodologias para o tratamento, prevenção e a proteção das crianças contra pneumonia: [10, 13]

- Promover o aleitamento materno exclusivo durante os primeiros 6 meses de vida;
- Cultivar o hábito de higienização das mãos com água e sabão;
- Evitar a poluição do ar em ambientes fechados;
- Prevenção da infecção pelo HIV;
- Garantir o tratamento de todas as crianças doentes e que possam ter acesso a cuidados de saúde adequados.

2.4 Meningite

Trata-se de um processo inflamatório do espaço subaracnóideo e das membranas leptomeningeas (pia-aracnóide), que envolve o encéfalo e a medula espinhal. A meningite pode atingir também estruturas do sistema nervoso central (SNC), dando origem a meningomielite e meningoencefalite. [14, 15]

A infecção do SNC e das suas membranas pode ser aguda (quando a infecção é causada por vírus ou bactérias) e crónica, (quando é causada por protozoários, espiroquetas, helmintos, fungos ou micobactérias).

2.5 Etiologia da Meningite

De ponto de vista clínico, as meningites podem ser divididas em meningites de liquor límpido, que se apresentam com um aspecto aparentemente normal e meningites purulentas, com liquor turvo. A grande maioria das infeções piogénicas, ou purulentas é produzida por: *Nisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus spp.*, e *Aerobacter* etc. [15]

As meningites de liquor límpido são causadas por vírus, fungos; também podem ser encontradas meningites tuberculosas e sífilíticas. [15]

3 Características gerais das bactérias

As bactérias são denominadas microrganismos procariotas por não possuírem membrana nuclear; são constituídas por uma estrutura simples e isentas de alguns organitos

celulares como, por exemplo, a mitocôndria, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático; os principais componentes das células bacterianas são: a parede celular, a membrana citoplasmática e os nucleotídeos. [16, 17,18]

As células procariotas têm várias formas; as quatro formas básicas bacterianas são: cocos, (esféricos), bacilos, (em forma de bastonetes), espiroquetas, (em forma espiralada) e vibrião, (em forma de vírgula). Medem aproximadamente (1 a 20 μm), possuem uma reprodução assexuada por bipartição. [16, 17,18]

Quanto à constituição da parede celular, existem dois tipos de bactérias: As "**bactérias Gram positivas**", cuja parede celular é constituída por uma camada espessa de peptidoglicano e as "**Bactérias Gram negativas**", com parede celular constituída por uma camada delgada de peptidoglicano, contém ácido murâmico e uma membrana externa sobreposta. Também se verifica a presença (ou não) de organitos especializados, como: esporos, flagelos e cílios. [16, 17,18]

As bactérias vivem no ar, na água, nas plantas e na terra. Milhares de diferentes espécies de bactérias têm o ser humano como o seu habitat. Algumas bactérias fazem parte da flora de diferentes partes do organismo humano numa relação parasitária permanente. Outras bactérias são capazes de causar doenças muito graves em seres humanos, como resultado de toxinas expelidas no processo metabólico bacteriano ou quando as bactérias invadem os tecidos e fluidos corporais estéreis do hospedeiro, causando lesão. [16, 17,18]

3.1 Principais bactérias causadoras de infecção no sangue

As bactérias mais frequentes, isoladas em hemoculturas são:

- 1) *Staphylococcus spp*; representados por cocos em forma de cacho, são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, catalase positiva e oxidase negativa. Estes tipos de bactérias fazem parte da microbiota da pele, das mucosas e locais que contém glândulas sebáceas. Estão subdivididas em dois (2) grupos: Bactérias produtoras da enzima coagulase (*Staphylococcus aureus*) e as não produtoras da coagulase (*Staphylococcus coagulase negativo*). [19]

*Staphylococcus*spp podem tornar-se patogénicos em pessoas com diminuição de imunidade e as infecções podem evoluir para sépsis. [20,21]

Staphylococcus spp são sensíveis a muitos antibióticos e resistentes a outros, sendo que, a resistência está subdividida em várias categorias: [22]

- 1) A produção da β -lactamase, enzima que faz com que os microrganismos se tornem resistentes aos β -lactâmicos, quebrando o anel β -lactâmico, e assim, podendo desactivar as propriedades antibacterianas do fármaco.
- 2) A produção da proteína de ligação à penicilina, (do inglês, PBPs “penicilium binding proteins”) por este grupo de bactérias.
- 3) A tolerância, ou seja, a ausência de enzimas capazes de causar lise da parede celular bacteriana.
- 4) A transferência de plasmídeos, que confere a presença de um gene capaz de neutralizar um determinado antibiótico.

Na prática corrente médica, estudam-se os seguintes *Staphylococcus* spp: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdnensis*, *S. hominis*, *S. schleiferi*, entre outros. Sendo que, as três (3) primeiras espécies são as que apresentam maior interesse do ponto de vista clínico. [19, 23]

3.2 *Staphylococcus aureus*

Muitas espécies fazem parte da microbiota da pele e mucosas, sendo *S. aureus* o principal microrganismo patogénico desta espécie; cresce em meio com elevado teor de cloreto de sódio (aproximadamente 10%, à temperatura de 37°C, num período de 18 a 24 horas). A enzima coagulase produzida por *S. aureus*, promove a conversão de fibrinogénio em fibrina que forma a capa protetora da bactéria, frente à acção fagocítica das células de defesa do organismo hospedeiro; também apresenta enzimas como lípases, que têm a função de hidrolisar os lípidios para permitir a invasão da bactéria na pele e tecidos subcutâneos do hospedeiro. [19, 23]

Os factores de virulência em *S. aureus* são baseados na produção de toxinas e enzimas produzidas pela bactéria. [19, 23]

As doenças causadas por *S. aureus* são classificadas em: invasão e lesão dos tecidos ou pelo resultado da acção das toxinas libertada pelo microrganismo. [19, 23]

3.3 Doenças causadas por invasão e lesão dos tecidos por *S. aureus*

A invasão e lesão dos tecidos são caracterizadas por uma infecção localizada da pele, incluindo: furúnculo, impetigo, celulite, abscessos, infecções de queimaduras e de feridas traumáticas ou cirúrgicas. A proliferação da infecção em tecidos vizinhos pode ocasionar uma bacteremia. A infecção pode tornar-se muito mais grave e dar origem à endocardite, pneumonia, meningite e, até mesmo sépsis. *S. aureus* também estão relacionados com infecções associadas a cateteres e próteses. [19, 23]

3.4 Doenças resultantes por acção de toxinas por *S. aureus*

As doenças resultantes por acção de toxinas por *S. aureus* são classificadas em: Intoxicação Alimentar Estafilocócica, Síndrome da Pele Escaldada e Síndrome do Choque Tóxico. [19, 23]

A Intoxicação Alimentar Estafilocócica é uma doença causada por ingestão de alimentos contaminados por toxinas libertadas por *S. aureus*. São conhecidas 7 enterotoxinas (A a H), sabe-se que a enterotoxina A é a mais importante de ponto de vista clínico. [19, 23]

A Síndrome da pele escaldada, (SSSS) é a reacção a uma infecção da pele resultante da acção das toxinas esfoliativas representadas sob duas formas distintas (ETA e ETB). A doença é precedida por uma infecção estafilocócica cutânea ou respiratória superior, à qual se dá a disseminação da toxina por via sanguínea; o doente apresenta dermatite esfoliativa bolhosas e descamação da pele; [19, 23]

Em geral a Síndrome da pele escaldada ocorre mais em lactentes e em crianças com menos de 5 anos de idade. Em adultos, a infecção muitas vezes está relacionada com indivíduos com diminuição da imunidade. [19, 23]

A Síndrome do choque tóxico estafilocócico, pode resultar da acção da toxina TSST-1 libertada por *S. aureus*. A toxina está associada ao órgão genital feminino no período menstrual (uso de tampões); também pode complicar qualquer infecção por *S. aureus*, por exemplo, infecções de feridas pós-operatórias e infecções de queimaduras. [19, 23]

Posteriormente, a toxina vai para o sangue causando, assim, a falência múltipla de órgão e toda a pele, incluindo as palmas das mãos e as plantas dos pés (descamam na totalidade). [19, 23]

3.5 *Staphylococcus* coagulase negativo

Staphylococcus coagulase negativos, pertencem ao gênero *Staphylococcus*, são bactérias Gram-positivo, em forma de cacho tétrada, fazem parte da microbiota normal da pele e dos tratos respiratório e gastrointestinal do homem. A sua identificação é feita após a prova de catalase e coagulase e com um antibiograma para evidenciar a sua sensibilidade aos antibióticos. As bactérias coagulase negativas de maior interesse clínico são: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* e *S. heamolyticus*. [24]

As doenças causadas por este tipo de bactéria são bastante variadas, sendo que, na sua maioria, têm origem hospitalar. Os *Staphylococcus* coagulase negativos, representam 11% de todos agentes infecciosos isolados em ambiente hospitalar, os mais frequentes estão associadas às infecções do sangue, causadas pelo uso de diferentes dispositivos médicos, tais como: cateteres e instrumentos intravasculares. Podem causar sépsis, infecção urinária, endocardite, peritonite, ventriculite e doenças crônicas associadas a plásticos. Os *Staphylococcus* coagulase negativos *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. heamolyticus*, estão associados à endocardite, sendo que, *S. epidermidis* está associado a infecções do sangue em geral. [24]

- 2) ***Streptococcus ssp***; com representantes esféricos (cocos) agrupados aos pares ou em cadeias, a maioria são anaeróbios facultativos, Gram-positivos, catalase negativos; são identificados como integrantes da microbiota intestinal, pele, trato respiratório e orofaringe. Os *Streptococcus ssp* crescem melhor em culturas enriquecidas com sangue ou líquidos teciduais e fermentam os carboidratos produzindo assim ácido láctico. [25,26, 27]

Existem mais de 100 espécies do gênero *Streptococcus*; para classificá-los são usados três diferentes esquemas que se completam: [25, 26, 27]

- **Propriedade serológica:** (grupo de Lancefield, representados pelas letras A até W),

- **Padrão hemolítico:** (hemólise completa **beta-β hemolítico**, hemólise parcial **alfa-α hemolítico** e sem hemólise **gama-γ hemolítico**).
- **Propriedade bioquímica:** Já esta propriedade divide os *Streptococcus* em 2 (dois) grandes grupos: *Streptococcus* β-hemolíticos, classificados nos grupos de Lancefield e os *Streptococcus*-α e γ-hemolíticos, representados por testes bioquímicos.

Streptococcus com maior valor clínico são: ***Streptococcus* do grupo-A, *Streptococcus* do grupo-B e *S. pneumoniae***; [25, 26, 27]

3.6 *Streptococcus pyogenes*

Pertencem ao grupo A de Lancefield, β-hemolíticos, cocos esféricos, apresentam-se em cadeias curtas em amostras biológicas e em cadeias longas quando cultivadas em meios líquidos, crescem em ágar sangue e são inibidos em meios com uma elevada concentração de glicose. [25, 26, 27]

Streptococcus pyogenes colonizam a orofaringe de crianças e de adultos jovens, podendo causar faringite e amigdalite bacteriana. As infecções de tecidos moles como Piodermite, Erisipela, Celulite e Fasceíte necrosante têm como origem uma prévia colonização da pele, por *S. pyogenes* do grupo A. [25, 26, 27]

A patogénese ou factores de virulência de *S. pyogenes*, deve-se ao facto do micro-organismo evitar a opsonização e fagocitose, aderir e invadir as células hospedeiras para causar infecção, produzir várias toxinas e enzimas. Estes factores de virulência clinicamente importantes são: [25, 26, 27]

- Cápsula de ácido hialurónico; Protege contra a fagocitose;
- Proteína M; importante na aderência da bactéria ao meio, também inibe a fagocitose e degrada o factor C3b do sistema do complemento;
- Hemolisinas; responsáveis pela hemólise em meios com eritrócitos. A estripe β-hemolítico: Estreptolisina O e S;
- Exotoxinas; pirogénicas estreptocócicas (Spe); estas toxinas funcionam como superantigénios, e têm um importante papel nas infecções que se apresentem com quadro, como: choque tóxico estreptocócico, fasceíte necrosante, miosite.

- Estreptodornases ou desoxirribonucleases (DNases); essas enzimas não são citolíticas, mas podem despolimerizar o ácido desoxirribonucléico (DNA) livre presente no pus. Este processo reduz a viscosidade do material do abscesso e facilita a disseminação dos microrganismos;

3.7 *Streptococcus pneumoniae*

São cocos Gram-positivos encapsulados, agrupados aos pares (denominados diplococos), medem 0,5 a 1,2 µm de diâmetro, são catalase negativos, anaeróbios facultativos; α-alfa hemolíticos em ágar sangue, criam um halo de hemólise de cor esverdeada em volta das colônias, por causa da presença da pneumolisina (enzima que degrada parcialmente as hemácias, deixando algum vestígio de hemoglobina na cultura); fazem parte da flora normal da nasofaringe e orofaringe de indivíduos saudáveis. [25, 26, 27]

S. pneumoniae é considerado um agente infeccioso exclusivamente para os seres humanos; pode colonizar a nasofaringe e é a principal causa de otite média aguda, sinusite, pneumonia adquirida na comunidade e meningite. É apontado como responsável por elevada taxa de morbidade e mortalidade em crianças em idade pré-escolar e em idosos, principalmente em países em desenvolvimento. De ponto de vista clínico, são apontados como um potencial invasivo e factores de virulência em infecções por *S. pneumoniae*: Os polissacarídeos da cápsula, as proteínas e adesinas de superfície, autolisina, hialuronidase, neurominidase e pneumolisina, [25, 26, 27]

3.8 *Streptococcus do grupo B*

Streptococcus agalactiae pertence ao grupo B de Lancefield, são cocos Gram positivos, (0,6 a 1,12 µm de diâmetro) agrupados em cadeias longas, anaeróbios facultativos, crescem em meios ricos em nutrientes; são bactérias β-hemolíticas. [25, 26, 27]

S. agalactiae integra a flora intestinal e do trato urogenital, também pode colonizar o trato respiratório superior. É a principal causa de sépsis neonatal e obstétrica; é, também, frequentemente associada à septicemia em idosos e doentes imunocomprometidos e a infecção do trato urinário em adultos. [25, 26, 27]

Os factores de virulência são: a produção de hemolisina, polissacarídeos específicos da cápsula (Ia, Ib e II a IX), peptidase C5a (em estripes humanas) e várias proteínas de superfície, ao ligar-se ao IgA humano, atuam como adesinas. [25, 26, 27]

Entre as hemolisinas produzidas por *S. agalactiae* podemos destacar ainda o fator CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) que é utilizado para identificação presuntiva de *S. agalactiae*. [25, 26, 27]

3.9 Manifestações clínicas *S. agalactiae*

S. agalactiae, ao colonizar o trato gastrointestinal e genital de mulheres grávidas, constitui um factor de risco para infecções invasivas neonatais com elevada morbidade e mortalidade. [25,26, 27]

Em mulheres grávidas, *S. agalactiae*, pode causar infecções não invasivas durante a gravidez e no período pós-parto, como amnionite, infecções do trato urinário, endocardite, infecções de feridas cirúrgicas de cesarianas e de episiotomias, celulite ou fascite e infecções invasivas mais raras como sépsis, meningite, osteomielite e endocardite. [25, 26, 27]

Em recém-nascidos, cerca de 80% das infecções ocorrem até 6 dias depois do parto, sendo denominadas infecções precoces. A infecção tardia ocorre entre 7 aos 90 dias após o nascimento. A infecção precoce é observada, frequentemente, no primeiro dia de vida do recém-nascido, com a ascensão de *S. agalactiae* no trato genital da mãe, podendo, assim, colonizar também o líquido amniótico, quando aspirado pelo feto, podendo originar doença invasiva ou nados mortos. A doença invasiva por este agente, nos recém-nascidos causa: pneumonia, sépsis, meningite, osteomielite ou atrite séptica. [24, 25, 26, 27]

S. agalactiae, para além de causar infecção intrauterina do feto, pode também causar infecção durante a passagem pelo canal de parto. [24, 25, 26, 27]

Em adultos, a infecção por *S. agalactiae*, é frequente em indivíduos imunodeprimidos; pode ser infecção da comunidade ou infecção relacionada com cateteres intravenosos. [24, 25, 26, 27]

- 3) ***Enterococcus ssp***; são bactérias do grupo D Lancefield, catalase negativos, cocos Gram-positivos, isolados aos pares formando curtas cadeias, anaeróbios facultativos,

crecem em gelose de sangue após 24 horas de incubação, apresentam colónias brancas, não hemolíticas ou α -hemolíticas. Crescem na presença de 6,5% de cloreto de sódio e 40% de sais biliares. Existem pelo menos 12 espécies. [27]

Fazem parte da microbiota comensal do aparelho digestivo do homem, sendo classificados como agentes patogénicos oportunistas. [27]

Os principais *Enterococcus* spp isolados em hemoculturas com valor clínico são *E. faecalis* e *E. faecium*. São responsáveis por infecções hospitalares, infecções pélvicas e intra-abdominais, infecção urinária, endocardite e sépsis. [27]

- 4) **Bacilos Gram-negativos;** bactérias em forma de bastonete, anaeróbias facultativas, fermentam a glicose e algumas a lactose, (característica diferencial para distinguir e separar a maioria das estripes deste grupo), Quando semeadas em MacConkey (meio selectivo e diferencial), as colónias apresentam-se de cor rosada, são oxidase-negativo, (por estarem desprovidas da actividade da citocromo-oxidase). São encontrados no trato gastrointestinal de seres humanos, na água, solo e vegetais contaminados. As bactérias isoladas na rotina microbiológica como, por exemplo: *Shigella* spp., *Yersinia Pestis* spp., e *Salmonella* spp., estão sempre associadas a doenças, quando isoladas no homem; Já, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., podem causar infecções oportunistas. [28, 29]

3.10 *Escherichia coli*

Existem cinco espécies do género *Escherichia*; *Escherichia coli* é a mais frequentemente isolada em amostras biológicas. Fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal, podem causar sépsis bacteriana, meningite neonatal, infecções das vias urinárias e gastroenterite em viajantes para países com condições precárias de higiene. [28, 29]

A estripe de bactéria *E. coli* podem ser diferenciadas com base nos antígenos somáticos (O), flagelados (H) e capsulares (K). Adicionalmente, a presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenha um papel importante na virulência da bactéria. [28, 29]

A maioria das estripes não apresentam risco para o hospedeiro, visto que fazem parte da microbiota intestinal. No entanto, algumas estripes causam gastroenterite e são classificadas com base nos seus factores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicos e serologia.^[28, 29]

Os principais grupos de *E.coli* patogénicos, associados ao consumo de alimentos são: *E.coli enteropatoénicas* (EPEC), *E.coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteroinvasivas* (EIEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *E. coli enteroaderentes* (ECEA).^[30]

3.11 *Klebsiella spp.*

Possuem uma cápsula proeminente responsável pela aparência mucóide das colónias isoladas e que estimula os factores de virulências dos microrganismos *in vivo*. O agente mais comumente isolado é *Klebsiella pneumoniae*.^[28, 29]

Nos seres humanos, *K. pneumoniae* faz parte da flora comensal do trato intestinal.^[7] *K. pneumoniae* está associada a pneumonia lobar primária adquirida na comunidade.

Os grupos com maior risco de desenvolver pneumonia causada por *K. pneumoniae* são os alcoólicos e indivíduos com comprometimento da função pulmonar, por não conseguirem retirar as secreções orais aspiradas, das vias respiratórias inferiores. A pneumonia causada por *Klebsiella spp* está frequentemente associada à destruição necrótica dos espaços alveolares, com formação de cavidade e produção de expectoração sanguinolenta. *Klebsiella spp.* também está associada a infecções de feridas, tecidos moles e vias urinárias.^[29]

- 5) **Bacilos Gram-negativos não fermentadores;** A principal característica deste grupo é o facto de serem incapazes de fermentarem a glicose no processo de produção de energia, apresentam resistência a vários antibióticos, são causadores de infecções hospitalares. Fazem parte deste grupo as seguintes bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*^[31]

3.12 *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do género *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, em forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, móveis, com metabolismo oxidativo; podem crescer em atmosfera aeróbica como anaeróbica; em meios sólidos, as estripes de *P. aeruginosa* produzem um pigmento fluorescente amarelo denominado (fluoresceína) que em combinação com o pigmento azul (piocianina) forma a cor verde que caracteriza as colónias em culturas em meios sólidos; ^[7, 9] crescem facilmente em diversos meios de cultura, produzindo, às vezes, odor adocicado ou semelhante à uva. ^[9]

P. aeruginosa possui vários factores de virulência, incluindo componentes estruturais (pili ou fimbrias, flagelos e cápsula de lipopolissacarídeos), toxinas (citotoxina A) e enzimas (exoenzimas S, U, T, X, elastase alcalina e fosfolipase). ^[32]

P. aeruginosa é um agente patogénico oportunista, frequente nos hospitais e, ocasionalmente, nas comunidades. Pode originar infecções praticamente em todos os órgãos, com gravidade variável: infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário, dermatite e foliculite, infecções graves na pele e tecidos moles, otite média e externa, infecções da córnea, sépsis e endocardite. ^[32]

As infecções causadas por *P. aeruginosa* podem ser difíceis de tratar porque as estripes são, frequentemente, resistentes a vários antibióticos. Os perfis de sensibilidade aos antibióticos podem variar de acordo com a estripe e a instituição, pelo que a realização do antibiograma é muito importante para a orientação terapêutica do doente. ^[32]

4 Métodos automatizados usados para o processamento das hemoculturas

Actualmente existem diversos equipamentos automatizados no mercado para a deteção de microrganismos em Hemoculturas. (BacT/ALERT VIRTUO[®], BACT/ALERT[®] 3D e BACTEC 9000[®]). Estes equipamentos apresentam grande vantagem em relação aos métodos manuais, visto que, fornecem resultados com maior rapidez e a diminuição do trabalho técnico. Normalmente, os protocolos de incubação para as hemoculturas são de 5 (cinco) dias, mas a maioria dos resultados positivos ocorre nas primeiras 48 horas. ^[33, 34]

Cada frasco de hemocultura incubado, possui um sensor que fornece ao equipamento a concentração de CO₂, resultante do metabolismo de microrganismos ou pelo consumo de O₂, necessário para o crescimento de microrganismo, utilizando assim, o método de fluorescência ou colorimetria. ^[33, 34, 25] Uma leitura positiva indica a presumível presença de microrganismos viáveis nos frascos de hemocultura. ^[34]

4.1 Vantagem dos equipamentos automatizados

Estes equipamentos possuem enúmeras vantagens, algumas citadas abaixo: ^[33, 36, 37]

- Ajuda no diagnóstico precoce das infecções da corrente sanguínea, para se obter melhores resultados dos doentes;
- Fornece um desempenho insuperável na detecção de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras;
- O controlo automático de qualidade integrado ao sistema que garante uma baixa taxa de falsos positivos, um tempo de resposta rápido e facilita a deliberação dos resultados negativos;
- Os frascos para hemoculturas são leves para reduzir o custo de descarte e envio;
- São utilizados frascos plásticos e inquebráveis para protegê-las contra a quebra e garantir a biossegurança;

4.2 Desvantagem dos métodos automatizados

A principal desvantagem dos métodos automatizados é o custo ainda elevado que algumas vezes não compensa. ^[33]



Figura 1. Equipamento para detecção de microrganismos em frascos de hemoculturas - BacT/ALERT VIRTUO®



Figura 2. Equipamento para detecção de microrganismos em frascos de hemocultura - Bacet/ALERT® 3D



Figura 3. Equipamento para detecção de microrganismos - BACTEC 9000®.

4.3 Método automático para coloração de Gram (Aerospray®)

Sistema automatizado para coloração de Gram que fornece um resultado rápido e padronizado para todos os tipos de amostras. São utilizadas lâminas de microscópio contendo uma preparação biológica com microrganismos; é feito esfregão para diferenciar microrganismos Gram positivos e Gram negativos. [25]

São aplicados às lâminas reagentes frescos e em baixas quantidades, de modo a evitar contaminação cruzada de deslizamento para a lâmina. O rendimento é elevado, usando um carrossel giratório de 30 lâminas. Num período de 5 (cinco) minutos, as lâminas estarão secas e prontas para serem observadas. [38]

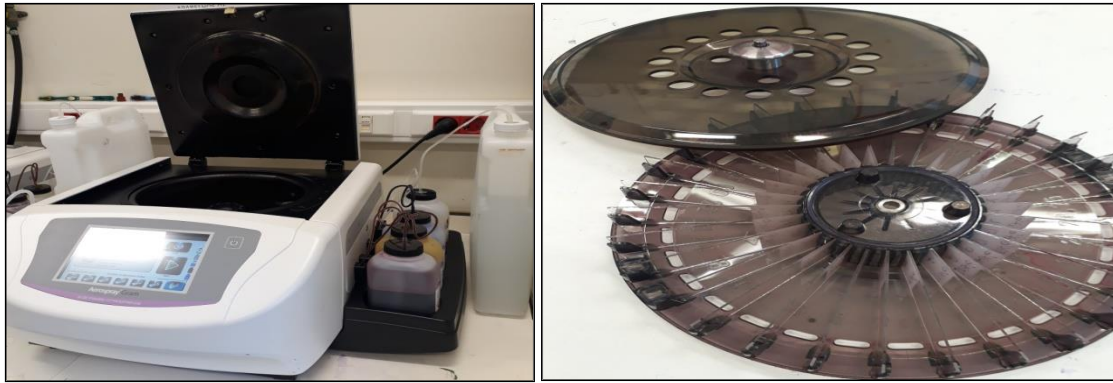


Figura 4. Equipamento para coloração automática de Gram - Aerospray® Gram.

4.4 MALDI - TOF

O MALDI (do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization*), é um equipamento automatizado de **espectrometria de massa**, no qual as amostras são ionizadas e vaporizadas por laser. Portanto, os íons gerados são aspirados, através de um campo elétrico, por um tubo vácuo até alcançarem o detector em tempo de voo, (TOF, *time of flight*). Quando mais rápido o íon se mover, o detector mede o TOF, e o computador calcula a massa e gera uma fórmula molecular. A combinação dessas duas técnicas é conhecida por MALDI - TOF. Os íons são colocados em gráficos, dando vários picos, para cada espécie de microrganismo e obtém-se um gráfico específico no qual uma base de dados computadorizada interpreta e fornece os resultados em pouco tempo. [39, 40]

O MALDI-TOF tem grandes vantagens por apresentar tecnologia de identificação rápida de agentes patogênicos - 5 a 15 minutos, fiável e preciso, menos dispendioso do que os métodos de detecção moleculares e imunológicos. É por esse motivo que cada vez mais está a atrair interesse aos microbiologistas que trabalham em LPC, porque a identificação precoce da etiologia da infecção diminui o tempo da hospitalização e os custos do internamento. [41, 42, 43] A desvantagem deste método é o elevado custo inicial do equipamento. [41]



Figura 5 Equipamento para identificação de microrganismos - MALDI - TOF

. Essa técnica permite diagnósticos complexos, como por exemplo, a identificação das diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo e fungos. [41]

4.5 MicroScan WalkAway e Vitek 2 Compact®

Para simplificar o fluxo de trabalho em LMC, são utilizados equipamentos inteligentes e automatizados para a identificação (ID) e teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (TSA) de agentes bacterianos, isolados nos produtos biológicos. Nomeadamente: **MicroScan WalkAway e Vitek 2 Compact®**. Estes equipamentos comportam um sistema automatizado baseado em diferentes métodos analíticos, tais como colorimetria, turbidimetria ou fluorometria, em que o desenvolvimento microbiano é detectado em painéis ou cartas de identificação, contendo diferentes substratos para alcançar a identificação e diluições seriadas de diferentes antibióticos, o que por sua vez, permite determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Norfolk Institute (CLSI). [43, 44, 45]

No sistema **Vitek 2 Compact®**, a ID e o TSA são realizados por meio de cartão de teste contendo diluições padronizadas de antibióticos distintos. Os resultados do ID são obtidos depois de 3 horas, mas pode durar de 5 a 7 horas em microrganismos de crescimento lento; os resultados do TSA podem levar 15 horas, com uma média de 9 horas. No sistema

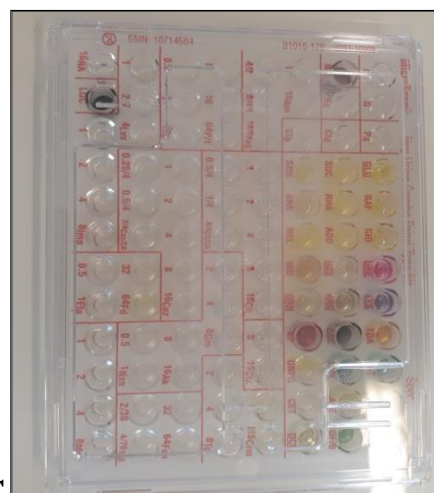
MicroScan WalkAway® as provas de ID e o TSA, (Microscan painéis, placas de microdiluição de 96 poços convencionais), os resultados da ID são obtidos em uma média de 4 horas e os resultados das TSA podem ser obtidos em 20 horas.^[44]



A



B

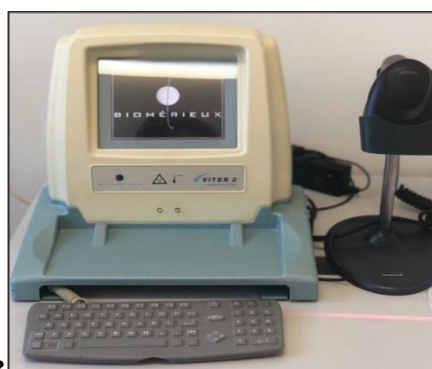


C

Figura 6. Equipamento automatizado para identificação de microrganismo e antibiograma: **A** MicroScan – WalkAway® 96. **B** Dispensador MicroScan. **C** Painel MicroScan



A



B



C

Figura 7. Equipamento para identificação e antibiograma: A Vitek 2 Compact®. B. C. Carta para antibiograma.

II. OBJECTIVOS

Objectivos gerais:

- Conhecer o que são hemoculturas, para que servem e como se estudam.

Objectivos específicos

- Acompanhar o modo correcto de colheita da amostra e acondicionamento. (Fase pré-analítica).
- Acompanhar o processamento das amostras, a identificação dos agentes microbianos e o perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos microrganismos isolados em hemocultura. (Fase analítica).
- Observar a comunicação dos resultados obtidos. (Fase pós-analítica).

III. RELATÓRIO DO ESTÁGIO

Foi um estágio observacional, cujas amostras tiveram origem nos Serviços Clínicos (SC) do CHLN, colhidas após a requisição médica, cumprindo todas as técnicas de assépsia rigorosamente estabelecidas nesta unidade hospitalar.

As identidades dos doentes não foram divulgadas neste relatório de estágio, de modo a garantir a privacidade dos mesmos. O presente relatório foi coadjuvado pelos técnicos e médicos patologistas, pertencentes ao LPC do HSM.

3.1 Fase pré-analítica

É nesta etapa que o médico deve orientar o doente sobre o tipo de exame que se pretende realizar. É importante que o doente saiba que é necessário a sua máxima colaboração para que haja sucesso no seu tratamento.

Também é a fase da preparação do material a usar na colheita da amostra e deve ser feita a identificação do doente nos frascos utilizados para hemoculturas: (nome completo do doente, cama, idade, sexo, local da colheita da amostra, o tipo da amostra, hora, a data da recolha da amostra e o nome da referida unidade hospitalar).

3.2 Técnicas de colheita da amostra para hemoculturas

Para a colheita das amostras devem ser obedecidos os seguintes passos:

- Efectuar um procedimento antiséptico na pele do doente com solução iodada e depois passar algodão embebido em álcool a 70%, com movimentos giratórios de dentro para fora, aguardar até a zona secar;
- Retirar a tampa de proteção do frasco da hemocultura e desinfetar com algodão embebido com álcool a 70% e deixar o algodão por cima do frasco até ao momento da inoculação do sangue;
- Em seguida, são feitas duas punções para a colheita de sangue venoso em lugares diferentes, utilizando materiais estéreis como: seringa e agulha, para evitar a possibilidade de contaminação da amostra;
- Para hemocultura, é recomendada uma colheita de 10 a 30 ml de sangue em adultos e 1 a 5 ml para crianças, cada punção é inoculada em dois frascos (primeiro um frasco

aeróbio, que corresponde às bactérias que crescem na presença de oxigénio e depois inocular um frasco anaeróbio, onde crescem bactérias na ausência de oxigénio);

- Homogeneizar as amostras com delicadeza e enviá-las ao laboratório.

3.3 Fase-analítica

A fase analítica começa depois da chegada das hemoculturas ao laboratório, corresponde ao processamento das amostras, utilizando equipamentos automatizados. Devem ser respeitados os seguintes critérios:

- Primeiro devem-se organizar os frascos e as folhas de trabalho, em ordem numérica;
- Em seguida, conferem-se os dados do doente na requisição, a origem do produto e o tipo de exame solicitado;
- Verificar se os frascos de hemoculturas cumprem os requisitos específicos das normas de colheita em relação à quantidade e observar eventuais critérios de rejeição;
- A folha de trabalho deverá acompanhar todo o processamento da amostra;
- São removidos os códigos de barra dos frascos e em seguida são colocados nas folhas de trabalho;
- De seguida as hemoculturas são encaminhadas e incubadas em aparelhos especializados, de acordo com as instruções específicas de cada equipamento; utilizando métodos automatizados tais como: (BacT/ALERT® 3D, BacT/ALERT VIRTUO®, e BACTEC 9000®), durante 5 dias ou mais, dependendo da hipótese do diagnóstico;

3.4 Procedimentos para o BACTEC 9000®

- Antes de colocar os frascos de hemoculturas no equipamento, deve-se seleccionar o tempo de incubação das mesmas no ecrã do equipamento;
- É feita a leitura do código de barra do frasco de hemocultura e em seguida faz-se a leitura do código de barra do doente;
- E por fim, acenderá uma luz a indicar o lugar seleccionado pelo equipamento para depositar os frascos de hemocultura;

3.5 Procedimentos para o Bact/ALERT VIRTUO®

- Neste equipamento, os frascos de hemoculturas são colocados na posição vertical, no tapete rolante da área de carregamento;

- A introdução dos frascos de hemoculturas no interior do equipamento e a leitura dos códigos de barra dos frascos de hemoculturas e dos doentes é totalmente automatizado;

3.6 Procedimentos para o Bact/ALERT MB®

- Primeiro é activado o código de barra para a introdução dos frascos de hemoculturas;
- Em seguida, é feita a leitura do código de barra de identificação do frasco de hemocultura, depois é repetido o mesmo procedimento para a identificação do código de barrado doente;
- Por fim acenderá uma luz a indicar o lugar onde pode ser colocados os frascos de hemocultura;

5 Hemoculturas positivas

Sempre que houver frascos de hemoculturas positivos, os aparelhos dão um alarme para remoção dos frascos do equipamento o mais rápido possível, para que se faça a sementeira e a coloração pelo método de Gram.

Os dados dos doentes e os resultados das hemoculturas positivas, são introduzidos no sistema aplicativo de gestão de dados usado neste laboratório chamado (Clinidata®XXI), a partir de um computador. Depois são impressas as etiquetas com a identificação dos doentes, que são colocadas nas tampas dos meios de cultura preparados para a sementeira primária.

5.1 Coloração pelo método de Gram

5.2 Técnica automatizada para coloração Gram

Amostra:

- Frasco de hemocultura positivo;

Material:

- Sistema automático de coloração (**Aerospray® Gram**);
- Câmara de fluxo;

- Lâmina de vidro;
- Seringa e agulha;

Procedimentos:

- Com uma agulha e seringa, aspira-se 1(um) ml de sangue do frasco de hemocultura e faz-se um esfregaço em uma lâmina de vidro e deixa-se secar;
 - Em seguida as lâminas são devidamente enumeradas;
 - Depois de secar as lâminas, são fixadas em chama e colocadas em um carrossel giratório;
- Posteriormente as lâminas são levadas ao equipamento automatizado (Aerospray® Gram) para a devida coloração;

Interpretação de resultados:

- Bactérias Gram-negativas, Bactérias Gram-positivas e Leveduras;

5.3 Técnica manual de coloração de Gram

Amostra

- Frasco de hemocultura positivo

Material

- Lâmina de vidro
- Seringa e agulha

Procedimentos

- Depois de confeccionar o esfregaço, deixar secar;
- Fixar as lâminas à chama;
- Corar com roxo/violeta de metilo durante 1 (um) minuto;
- Lavar com água corrente ou com água destilada;
- Cobrir com Lugol, durante 1 (um) minuto;
- Descorar com álcool a 96°, durante 30 segundos,
- Lavar com água corrente ou água destilada;
- Corar com fucsina diluída durante 1(um) minuto;
- E, por fim, lavar com água corrente ou água destilada, secar e observar ao microscópio.

Interpretação de resultados:

- Bactérias Gram-negativas, Bactérias Gram-positivas e Leveduras;

5.4 Técnica para sementeira

Amostra

- Frascos de hemoculturas (aerobiose e anaerobiose).

Material

- Câmara de fluxo laminar;
- Agulha e seringa;
- Placas de gelose de sangue x (2);
- Placa de meio A;
- Ansa de plástico;
- Lâmina;
- Jarra de anaerobiose;
- Estufa;

Procedimentos

Com ajuda de um "scanner" (leitor de código de barra), são introduzidos os dados do doente no computador, as etiquetas com as identificações do doente e são colocadas nas placas de meios de culturas. Seguem-se os seguintes procedimentos:

- Numa câmara de fluxo laminar, agitar suavemente o frasco de hemocultura;
- Em seguida, inserir uma agulha para ventilar o frasco e colocar uma seringa na agulha, aspirar aproximadamente 1(um) ml da amostra;
- Posteriormente é inoculada uma gota em meios de cultura sólidos;
- Frascos de aerobiose: é semeado 1 (uma) placa de gelose de sangue;
- Frascos em anaerobiose: são semeados 1 (uma) placa de gelose de sangue mais 1 (uma) placa de meio A;
- Em seguida realiza-se esfregaço em lâminas para coloração de Gram;
- São colocadas etiquetas nas folhas de trabalho e nas primeiras hemoculturas da manhã em aerobiose, para se diferenciar das próximas hemoculturas do dia;

- As primeiras hemoculturas do dia são incubadas a uma atmosfera de 37°C com 5% de dióxido de carbono, durante 4 horas;
- As placas de meio A, são incubadas a uma atmosfera de anaerobiose num período de 18 a 48 horas à temperatura de 37°C, as próximas placas de hemoculturas aeróbicas, são incubadas em atmosfera de aerobiose durante 18 a 24 horas à 37°C;
- Os frascos de hemoculturas são colocados na estufa a 37°C, onde são armazenados para próximos estudos; só serão descartados quando os resultados das hemoculturas estiverem concluídos.

5.5 Sementeira primária

Tabela 1. Sementeira primária

Os diferentes tipos de frascos para hemoculturas	Meios de culturas
1. Anaerobiose (frascos com tampa de cor laranja)	a) Meio de ágar-sangue (COH) b) Meio de Anaerobiose (A)
2. Aerobiose (frascos com tampa de cor verde) e pediátrica (frascos com tampa de cor amarela)	c) Meio de COH
3. Anaerobiose (garrafas com tampa de cor roxa)	d) Meio de COH e) Meio A
4. Aerobiose (frascos com tampa de cor azul)	f) Meio de COH

Depois de semeadas, as placas de Gelose de sangue são incubadas em uma estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C; são observadas depois de 4 (quatro) horas; as placas de Meio A, são colocadas em jarras de anaerobiose e incubadas em estufa com uma temperatura de 37°C, durante 24 horas.

Os frascos de hemoculturas são conservadas em estufa de 37°C para futuros estudos, até que se termine o diagnóstico.

5.6 Hemoculturas em aerobiose das 4 horas

As primeiras hemoculturas da manhã são observadas depois de 4 horas; se houver crescimento de colónias de microrganismos, é feito um estudo de identificação. O resultado é enviado, de imediato, ao clínico para iniciar a terapêutica específica, de acordo o agente patogénico encontrado na hemocultura.

6 Orientação para as hemoculturas

O resultado da observação do esfregaço de hemocultura corado pelo Gram dá origem a novas passagens, se necessário; é registado nas folhas de trabalho e no Clinidata®XXI, para orientar a terapêutica do doente.

As novas passagens são semeadas de acordo com o tipo de bactéria que é observada no método de Gram, segundo a tabela 2:

Tabela 2. Novas passagens de hemoculturas

Observação de Gram	Meio para novas passagens
1) Bacilos Gram – negativos	a) Meio de ágar- MacConkey (MAC) b) ANC
2) Bacilos Gram – positivos	c) Meio de ágar-chocolate (PVX) d) Meio de MAC
3) Cocos Gram Positivos- <i>Streptococcus</i>	e) Meio de PXV e ANC
4) Cocos Gram positivos- <i>Staphylococcus</i>	f) Isentos de nova passagem
5) Gram positivos - Leveduras	g) Placa de Agar Sabouraud dextrose (ASD),

6.1 Observação das hemoculturas de 24 horas

No dia seguinte, isto é, depois de 24 horas de incubação, observa-se o crescimento de bactérias nos meios semeados no dia anterior. As características morfológicas e tintoriais que as colónias microbianas apresentam em meios de cultura, são fundamentais para a orientação de outras passagens (re-isolamento de microrganismos), os exames complementares para a

comprovação de microrganismo em estudo, a identificação do agente infeccioso e, por fim, o antibiograma.

Antes de observar as hemoculturas recentes, primeiro são introduzidos os dados do doente no computador, com o propósito de se obter informações sobre as hemoculturas contemporâneas e para se saber se existem hemoculturas em curso do mesmo doente ou se existem hemoculturas positivas em estudo e se há relação sobre as características morfológicas e tintoriais entre os agentes microbianos presentes nas hemoculturas contemporâneas e a hemocultura recente do doente.

Tabela 3. Orientação para estudos de *Staphylococcus* Coagulase Negativos

<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos	
Hemoculturas	Orientação
1) Observação de Gram: Cocos Gram positivo em forma de cacho; 2) 1 (Uma) hemocultura positiva do mesmo doente e outra/s em curso; 3) Em placa Ágar sangue: Colônias pequenas, opacas, convexas e de coloração branca;	a) Coagulase;
4) Observação de Gram: Cocos Gram positivo em forma de cacho; 5) 2 (Duas) ou mais hemocultura positivas do mesmo doente; 6) Em placa Ágar sangue: Colônias pequenas, opacas, convexas e de coloração branca;	b) Identificação e antibiograma;

Tabela 4. Orientação para estudo de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Hemoculturas	Orientação
1) Observação de Gram: Cocos Gram positivo em forma de cacho; 2) 1 (Uma) hemocultura positiva do mesmo doente e outra/s em curso; 3) Em placa Ágar sangue: Colónias grandes, opacas, convexas e de coloração branca com pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado;	a) Identificação e antibiograma;
4) Observação de Gram: Cocos Gram positivos em forma de cacho; 5) 2 (Duas) ou mais hemocultura positivas do mesmo doente; 6) Em placa Ágar sangue: Colónias grandes, opacas, convexas e de coloração branca com pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado;	b) Coagulase em todas as hemoculturas e estudar apenas 1 (uma) hemocultura: identificação e antibiograma

6.2 Provas de coagulase:

Principio

A coagulase actua sobre o fibrinogéno transformando-o em fibrina; logo, caso se verifique aglutinação, a prova é positiva; pode ser feita em tubo ou em lâmina.

6.3 Prova de coagulase em tubo

Amostra:

- Placa com cultura em estudo

Reagentes:

- Plasma de coelho citratado ou com EDTA

Material:

- Tubo de vidro
- Ansa de plástico
- Bico de Bunsen ou lamparina
- Banho-Maria

Procedimentos:

- Próximo de uma lamparina ou de um bico de Bunsen, isolar uma colónia da cultura em estudo, e inocular em um tubo de vidro com 0,5 ml de plasma de coelho e incubar a 35-37°C, em banho-Maria, durante 2-4 horas.

Resultados:

- **Reacção Positiva**-formação de coágulo: (*Staphylococcus aureus*);
- **Reacção negativa**-ausência de coágulo: (*Staphylococcus coagulase negativos*).

6.4 Prova de coagulase em Lâmina**Amostra:**

- Placa com cultura em estudo

Reagente:

- Plasma de coelho

Material:

- Lâmina de vidro
- Ansa de plástico

Procedimentos:

- Colocar Plasma de coelho em uma lâmina de vidro;
- Com uma ansa, tirar uma colónia da cultura em estudo e colocar na lâmina que contém Plasma de coelho e emulsionar;

- Observar durante 10 a 15 segundos;

Resultados:

- Reação positiva-Presença de aglutinação: (*Staphylococcus aureus*)

Tabela 5. Orientação para estudo de *Streptococcus spp*

<i>Streptococcus spp</i>	
Hemoculturas e Actividades Hemolítica das Bactérias	Orientação
1) Observação de Gram: Cocos Gram positivos aos pares, ligeiramente alongados; 2) Placa de Ágar sangue: α -hemolítico;	a) Prova de Optoquina e antibiograma;
3) Observação de Gram: Cocos Gram positivos em cadeia; 4) Placa de Ágar sangue: hemólise do tipo β -hemolítico;	b) Identificação e antibiograma;
5) Observação de Gram: Cocos Gram positivos em cadeia; 6) Placa de Ágar sangue: γ -hemolítico ou sem hemólise; pequenas, opacas, convexas e de cor branca;	c) Identificação e antibiograma;

6.5 Prova de Optoquina

Princípio:

A prova de Optoquina é um derivado do quinino, inibe selectivamente o crescimento de *S. pneumoniae* em concentrações mínimas. São utilizados discos de papel de filtro impregnados

com Optoquina, em formato de teste de difusão em disco, para se determinar a susceptibilidade dos pneumococos.

Reagentes:

- Placa de gelose de sangue
- Disco de Optoquina de 5µg

Material:

- Ansa de plástico;
- Bico de Bunsen;
- **Procedimentos:**
- Com uma ansa, isolar uma colônia da cultura em estudo e semear numa placa de gelose de sangue em estrias numa área de aproximadamente 3 cm;
- Colocar um disco de Optoquina no centro da área semeada e incubar durante 18 a 24 horas a 35°C em atmosfera de 5% de CO₂;

Resultados:

- **Reacção positiva:** Formação de um halo de inibição em volta do disco: *S. pneumoniae* é sensível à Optoquina;

6.6 Teste de Catalase

Princípio:

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. A prova de catalase é utilizada para diferenciar membros de *Micrococcaceae* dos membros de *Streptococcaceae*.

Amostra:

- Placa com cultura de microrganismos em estudo;

Reagente:

- Peróxido de Hidrogênio 3%;

Material:

- Ansa de plástico;

- Lâmina de vidro;

Procedimentos:

- Com uma ansa, transferir uma colónia da cultura em estudo para uma lâmina de vidro;
- Adicionar uma gota de peróxido de Hidrogénio a 3% e observar de imediato;

Resultados:

- **Reacção positiva:** formação de bolhas de ar; (*Staphylococcus spp*)
- **Reacção negativa:** Não há formação de bolhas de ar;

Tabela 6. Orientação para estudos de *Streptococcus/Enterococcus*

<i>Streptococcus/Enterococcus</i>	
Hemoculturas	Orientação
1) Observação de Gram: Gram positivos, cocos aos pares ou em cadeias curtas; 2) 1 (uma) hemocultura positiva e outra/as em curso do mesmo doente; 3) Placas de hemoculturas: ágar gelose de sangue (γ e α -hemolítico); 4) Ágar MacConkey: ligeiro crescimento;	a) Identificação do agente bacteriano e antibiograma;
5) Observação de Gram: Gram positivos, cocos aos pares ou em cadeias curtas; 6) 2 (duas) hemocultura positivas do mesmo doente ou mais; 7) Placas de hemoculturas: ágar gelose de sangue (γ e α -hemolítico); 8) Ágar MacConkey: ligeiro crescimento;	b) Identificação do agente bacteriano e antibiograma;

Tabela 7. Orientação para estudos de Fungos

Fungos	
Hemoculturas	Orientação
1) Observação de Gram: Leveduras Gram positivas; 2) 1 (uma) hemocultura positiva do mesmo doente e outra/s em curso;	a) Exame directo a fresco, identificação e antifungigrama;
3) Observação de Gram: Leveduras Gram positivas; 4) 2 (duas) Hemoculturas positivas do mesmo doente;	b) Exame directo a fresco, identificação e antifungigrama, em 1 (uma) hemocultura;

6.7 Exame directo a fresco de Fungos

Material:

- Placa com cultura
- Microscópio óptico;
- Lâmina
- Lamela;
- Ansa de plástico;
- Conta-gotas;

Reagente:

- **Água destilada**

Procedimentos:

- Com um conta-gotas, deitar uma gota de água destilada em uma lâmina;
- Com uma ansa isolar uma colónia do microrganismo em estudo e homogenizar a preparação;

- Colocar uma lamela por cima da preparação, e observar ao microscópio óptico com objectiva de 40x;

Resultado:

- Podem ser observados, elementos **leveduriformes** do **fungo**

6.8 Prova de filamentação em Lâmina

Material:

- Placa com cultura;
- Tubo de ensaio;
- Microscópio óptico;
- Lâmina;
- Lamela;
- Ansa de plástico;
- Conta-gotas;

Reagente:

- Soro humano;

Procedimentos:

- Com uma ansa de plástico, isolar uma colónia de microrganismo em estudo e suspender em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de soro humano;
- Homogenizar a solução e incubar durante 2 (duas) horas a 37°C;
- Com uma conta-gota, colocar uma gota da suspensão em uma lâmina, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio óptico com objectiva de 40x;

Resultados:

- Observação de pseudo-hifas: identificação presuntiva de *Candida albicans*.

Tabela 8. Orientação para estudo de bactérias Gram-positivas

Bactérias Gram-negativas	
Hemoculturas	Orientação
1) Observação de Gram: bactérias Gram negativas em forma de bastonete; 2) 1 (uma) hemocultura positiva e outra/s hemoculturas do mesmo doente em curso; 3) Ágar MacConkey: bactérias fermentadoras da glicose;	a) Identificação e antibiograma;
4) Observação de Gram: bactérias Gram negativas em forma de bastonete; 5) 2 (duas) ou mais hemoculturas positivas do mesmo doente; 6) Ágar MacConkey: bactérias fermentadoras da glicose;	b) Estuda-se só uma única hemocultura; c) Identificação e antibiograma; d) Copiar os resultados para as outras hemoculturas do mesmo doente
7) Observação de Gram: bactérias Gram negativas em forma de bastonete; 8) 1 (uma) hemocultura positiva e outra/s hemoculturas do mesmo doente em curso; 9) Ágar MacConkey: bactérias não fermentadoras de glicose, colónias esverdeadas, grandes, translúcidas e de odor frutado;	e) Prova da Oxidase, identificação e antibiograma.
10) 2 (duas) ou mais hemoculturas positivas do mesmo doente;	f) Prova de Oxidase; só se estuda uma hemocultura (identificação e antibiograma);

11) Ágar MacConkey: bactérias não fermentadoras da glicose, colónias esverdeadas, grandes, translúcidas e de odor frutado;	g) Copiar os resultados para as outras hemoculturas do mesmo doente;
--	--

6.9 Prova da oxidase

Princípio

A prova da oxidase é baseada na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria. A prova é útil para diferenciar bactérias fermentadoras de bactérias não fermentadoras, (como por exemplo, *Pseudomonas* spp.)

Amostra:

- Placa com cultura de microrganismos;

Reagente:

- Solução aquosa a 0,5% de Cloridrato de Tetrametil-p-fenilenodiamina;

Material:

- Placa de Petri;
- Papel de filtro;
- Ansa de plástico;

Procedimentos:

- Colocar um papel de filtro em uma placa de Petri e adicionar algumas gotas do reagente (Solução aquosa a 0,5% de Cloridrato de Tetrametil-p-fenilenodiamina);
- Deixar o papel de filtro absorver o reagente e com auxílio de uma ansa de plástico, isolar uma colónia da cultura em estudo sobre o papel de filtro;

Resultados

- **Oxidase positiva:** produção de cor roxa após alguns segundos, no local da inoculação da colónia em estudo – *Pseudomonas* spp;

Oxidase negativa: não há mudança da cor no papel de filtro no local da inoculação da cultura em estudo

6.10 Orientação de falsos positivos

No caso de hemoculturas positivas em que não se observam microrganismo no Gram nem nos exames culturais (falso positivo), fazem-se subculturas:

Tabela 9. Orientação para estudos de falsos positivos.

Falsos positivos	
Hemoculturas	Orientação
1) Hemoculturas: Positivas; 2) Observação de Gram: Negativo; 3) Exame cultural: Negativo;	a) COH; b) PVX (CO ₂); c) Meio A; d) Esfregaço corado pela laranja de acridina;

7 Sistemas automatizados para identificação de microrganismos e antibiograma

7.1 Técnica para identificação de microrganismos utilizando MALDI-TOF

.Amostra:

- Placa com cultura de microrganismos em estudo;

Reagente:

- Matriz orgânica em solução aquosa acidificada;

Material:

- MALDI-TOF;
- Placa
- Palitos;

Procedimentos:

- Com um palito é isolada uma pequena quantidade da amostra do material biológico em estudo, e é transferida directamente da placa de cultura para a placa de MALDI-TOF;
- Em seguida é recoberta por uma matriz orgânica em solução aquosa acidificada;
- A placa é colocada no equipamento;

Resultados:

- Identificação de microrganismo;

7.2 Técnica para identificação e antibiograma utilizando VITECK 2 Compact**Amostra:**

- Placa com cultura de microrganismos em estudo;

Reagente:

- Solução de Cloreto de sódio 0,45%;

Material para Viteck2 Compact

- Viteck2 Compact
- Tubos de ensaio de vidro;
- Carta de identificação;
- Carta para antibiograma (Gram positivos, Gram negativo e leveduras);
- Dispensador de solução salina;
- Densichek (aparelho que mede a densidade da amostra);
- Vortex;
- Ansa de plástico estéril;
- Suporte para tubo de ensaio e cartas;

Procedimentos:

- Ligar o Densichek; com um tubo de ensaio de vidro com 3 ml de solução salina e calibrado o equipamento a 0 (zero) Mac Farland (McF);
- Colocar 3 ml de solução salina a 0,45% num tubo de ensaio;

- Com uma ansa estéril transferir algumas colónias isoladas da placa com cultura de bactérias em estudo;
- Homogeneizar a suspensão com auxílio de um Vortex;
- Fazer a leitura da turbidez com auxílio de um Densicheck: (0,5 a 0,6 para bactérias e 1,8 a 2,2 para fungos (McF));
- Colocar o suporte com a preparação no aparelho e programar o que se pretende estudar: cartas para identificação de microrganismo (se a cultura ainda não foi identificada) e a carta de antibiograma;
- As cartas são colocadas em contacto com a solução através de um tubo de aspiração ligado à carta;
- Em seguida o suporte é colocado no Viteck2 Compact e incubar a 37°C durante 12 horas;

Resultados:

- Identificação e antibiograma de microrganismos;

7.3 Técnica para identificação e antibiograma utilizando MicroScan WalkAway 96 Plus

AMOSTRA:

- Placa com cultura de microrganismos em estudo;

REAGENTE:

- Soro fisiológico estéril;

MATERIAL:

- MicroScan WalkAway 96
- Painéis MicroScan para: (identificação e antibiograma);
- Placa de inóculo;
- Inoculador;
- Dispensador;

PROCEDIMENTOS:

- Introduzir os dados do doente no computador, imprimir a etiqueta e colar nos painéis;
- Com um inoculador, tomar uma ou duas colónias de microrganismo em estudo;

- Introduzir o inoculador no diluidor e misturar delicadamente, aproximadamente 5 (cinco) vezes;
- Despejar o conteúdo do frasco diluidor na placa de inóculo sem bolhas, linearmente e cobrir a placa;
- Com um dispensador, tomar a solução da placa de inóculo e dispensar para o painel MicroScan;

Resultados:

- Identificação de microrganismo e o respectivo antibiograma;

7.4 Antibiograma por método manual (Método de kirby-bauer).

AMOSTRA:

- Placa com cultura de microrganismos em estudo;

REAGENTE:

- Solução fisiológica estéril;

MATERIAL:

- Placa de Mueller-Hinton;
- Discos de antibióticos;
- Bico de Bunsen ou lamparina;
- Ansa de plástico;
- Pinça;

PROCEDIMENTOS:

- Isolar algumas colónias puras de culturas de microrganismos em estudo, com auxílio de uma ansa, colocar em solução fisiológica estéril;
- Homogeneizar a suspensão com auxílio de um Vortex;
- Fazer a leitura da turbidez com auxílio de um Densichek com a escala de (0,5 - 0,6) para bactérias e (1,8 - 2,2) para aos fungos (McF);
- Realizar a inoculação da suspensão em uma placa de Mueller-Hinton;
- Com uma pinça, colocar os discos de antibióticos pressionar suavemente;

- Incubar as placas durante 16 a 24 horas, a uma temperatura de aproximadamente 37°C;

RESULTADOS:

- Formação de um halo de inibição em volta do disco de papel impregnado em antibiótico → Sensível;
- Quando não se forma um halo de inibição à volta do disco de papel impregnado em antibiótico → Resistente;

IV. Controle de qualidade (CQ) de Hemocultura no LMC do HSM

O LMC precisa participar regularmente de programas de CQ externos (troca de amostras com laboratórios de referência), assim como CQ internos (amostras fornecidas a partir do próprio laboratório).

CQ para coloração de Gram e laranja de acridina

As estripes microbianas utilizadas no CQ para coloração de Gram e laranja de acridina no LMC do HSM, são inoculadas em garrafas de hemoculturas e depois são coloradas em lâminas. Não se aplica o controle negativo.

O CQ para a coloração de Gram é feito numa frequência semanal e para a coloração de laranja de acridina é feito numa frequência quinzenal.

Coloração de Gram

- Controle positivo: *S. aureus* ATCC 29213 e *E.coli* ATCC25922.

Coloração de laranja de acridina

- Controle positivo: *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922

CQ para provas bioquímicas

O controle positivo para as provas bioquímicas no LMC do HSM, faz-se numa frequência sempre que necessário em novos lotes e também não se aplica controle negativo.

Prova de catalase

- Controle positivo: *S. aureus* ATCC 29213

Prova da oxidase

- Controle positivo: *P. aeruginosa* ATCC 27853

Prova da optoquina

- Controle positivo: *S. pneumoniae*- EIH

Coagulase em tubo - plasma de coelho

- *S. aureus* ATCC 29213

CQ para TSA em equipamentos automatizados (Walkaway e Vitek 2 compact)

O CQ para TSA em Walkaway e Vitek 2 compact são feitos quinzenalmente para estirpes viáveis. As estirpes de referência são:

- *E. coli* ATCC 25922
- *S. aureus* ATCC 29213
- *E. faecalis* ATCC 29212

CQ para TSA manual

O CQ para TSA manual é feito mensalmente. As estirpes de referência são:

- *E. coli* ATCC 25922
- *S. aureus* ATCC 29213
- *E. faecalis* ATCC 29212
- *P. aeruginosa* ATCC 27853

V. CONCLUSÃO

Durante o estágio realizado no LMC do HSM, aprendi que a hemocultura é uma prova laboratorial que tem como objetivo pesquisar microrganismos na corrente sanguínea de doentes, quando há uma suspeita de um quadro infeccioso.

Em LMC, são utilizados equipamentos automatizados para a detecção de microrganismos, em frascos de hemoculturas. Tais como: (Bact/ALERT Virtuo[®], Bact/ALERTE 3D[®] e BACTEC 9000[®]). Estes equipamentos fornecem resultados rápidos, aproximadamente durante 5 (cinco) dias ou mais. Mas a maioria dos resultados positivos ocorrem nas primeiras 48 horas.

Para a identificação e antibiograma de hemoculturas, são utilizados equipamentos automatizados, que são: MALDI-TOF, Microscan WalkAway 96 plus[®] e Vitec 2 Compact[®].

Também aprendi que a utilização de equipamentos automatizados nos estudos de hemoculturas, contribui para o diagnóstico precoce e na orientação e terapêutica antibiótica, em doentes suspeitos de um quadro infeccioso.

Estes conhecimentos adquiridos no estágio realizado no LMC do HSM, sobre o estudo de hemoculturas, pretendo aplicar nos laboratórios dos hospitais do meu País de origem, para contribuir para a terapêutica de infecções da corrente sanguínea.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Betty Ciela, (2007), *hematologia na prática clínica*, lusodidacta, 2, 15-18.
2. Dr. Herman Pomeranz et al., *O médico familiar*, Marujo Editora, 5ª Edição, 135-144.
3. Fonte: [Internet], disponível em: [// www.ebah.com
br/content/ABAAAA7n4J/hemocultura-tecnica-hemocultura](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7n4J/hemocultura-tecnica-hemocultura). Acedido em 21/10/2018
4. Fonte: [Internet], Silva. C., sena K.X. chiappeta, A.A. et al., (2006) *Incidência Bacteriana em hemocultura* Newlab, 77. 132-144.
5. Salomão Reinaldo, (2004), et al., *Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar de infectologia*, Manole Lda, Cap.14, 175-182.
6. Winn Jr. Washington, et al., (2008), *Diagnóstico Microbiológico*, Guanabara koogan, 5ª Edição, 2. 67-108.
7. Fonte: [Internet], disponível em: [https://www.cdc.gov/medical/releases/2017/p0831-sepsis-recognition-treatment.htr](https://www.cdc.gov/medical/releases/2017/p0831-sepsis-recognition-treatment.html). Acessado aos: 13/06/2019.
8. Ana Catarina Castro, et al., (2019), 2, 17-23, *Infeção e Sepsis*, Germano do Carmo.
9. Winn Jr. Washington, et al., (2008), *Diagnóstico Microbiológico*, Guanabara koogan, 5ª Edição, 2. 67-108.
10. Fonte: [Internet], Disponível em: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia#](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia) (2019). Acessado aos: 12/08/2019.
11. Dr. Pedro Pinheiro (2019), *Pneumonia é contagiosa?*, MD.Saúde. Disponível em: [https://www.mdsaude.com.pneumologia/pneumonia-contagiosa](https://www.mdsaude.com/pneumologia/pneumonia-contagiosa). Acessado aos: 12/08/2019.
12. Fonte: [Internet], Jacob AM Stadler, et al., (2017), *ultrasonografia pulmonar para o diagnostic de pneumonia adquirida na comunidade em crianças*, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5608773/>, Acessado aos: 12/08/2019.
13. Fonte: [Internet], Inge Axelsson et al., (2011), *pneumonia mortality among children in Brasil a success story*, Jornal de Pediatria. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2080>. Acessado aos: 12/08/2019.
14. Maria de Souza, et al., (2006), *Assistência de Enfermagem em Infectologia*, Atheuu, cap. 26, 225-234.
15. Helvio José et al., (2002), *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Revinter, 37, 330-338.
16. Azevedo Carlos et al., (2014), *Biologia Celular e Molecular*, editec@lidel.pt, cap. 1, 1-19.

17. Murray R. Patrick et al., (1990), *Microbiologia Médica*, Goanabara Koogan, cap. 1, 3-7.
18. Jawetz Ernest, et al., (1998), *Microbiologia Médica*, Guanabara Koogan S.A. ed, cap. 2, 5-26.
19. Ferreira wanda, et al., *Microbiologia*, (2000), Lidel, v.2, cap. 2, 39-49.
20. Fonte: [Internet], Chang HJ; et al., (2010). *Sépsis*. JAMA 304 (16): 1856
21. Fonte: [Internet], Iwashyna, TJ, et al., (2010) *long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis*. JAMA 304 (16): 1787-94.
22. Jawetz Ernest, et al., *Microbiologia Médica*, (1998), Goanabara Koogan, cap. 14, 146-150.
23. Patrick R. Murray, et al., *Microbiologia Médica*, (2017), Elsevier Editora Ltda, 8ª edição, cap. 18, 170-182.
24. Baker Carlos, et al., *Red Book® Atlas de Doenças Infecciosas em pediatria*, (2018), Goanabara Koogan, 3ª edição, cap. 125, 563-582.
25. Barros Helena, et al., *Microbiologia Médica*, editec@lidel.pt, (2014), v.1, Cap. 21, 276-389.
26. Jawetz Melnick, et al., (1998), *Microbiologia Médica*, Guanabara Koogan S.A. ed. 20, cap. 15, 150-160.
27. Patrick R. Murray, et al., *Microbiologia Médica*, (2017), Elsevier Editora Ltda, 8ª edição, cap. 19, 183-201.
28. Jawetz Melnick, et al., (1998), *Microbiologia Médica*, Guanabara Koogan S.A. ed. 20, cap. 16, 162-169.
29.) Patrick R. Muray, *et al.*, (1990), *Microbiologia Médica*, Guanabara Koogan, Cap 9, 73-83.
30. Fonte: [Internet], disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>.
31. Fonte: [Internet], Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dillinger RP, Fein AM, Knaus WA et al., (1999) *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis: The ACCO/SCCM Consensus Conference Committee. CritCareMed*. 20:864-74.
32.) Barros Helena, et al., *Microbiologia Médica*, editec@lidel.pt, (2014), v.1, Cap.30, 384-389.

33. Fonte: [Internet], Maria Rita Elmor de Araujo, (2012), *Hemocultura: recomendação de coleta, processamento e interpretação dos resultados*, Disponível em: www.iqg.com.br/pbsp/img_up/01355393320.pdf. Acessado aos: 07/08/2019.
34. Fonte: [Internet], *Cultura de sangue automatizada, BACTEC™ 9240/9120/9050*, Disponível em: <http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-9000bc2.pdf>. Acessado aos: 07/08/2019.
35. Washington Winn, Jr, et al., (2014), *Diagnóstico Microbiológico*, Guanabara Koogan, 5ª Edição, cap, 2, 102-103.
36. Fonte: [Internet], *Bact/Alert Virtuo*. Disponível em: <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/Bact-Alert-Virtuo>. Acessado aos: 07/08/2019.
37. Fonte: [Internet], *Bact/Alert 3D*. Disponível em: <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/bact-alert-3d-healthcare>. Acessado aos: 07/08/2019.
38. Fonte: [Internet], *Aerospray Gram Series 2*. Disponível em: <https://www.elitechgroup.com/product/aerospray-gram-series>. Acessado aos 08/08/2019.
39. Fonte: [Internet], Cinzia Benagli, et al.,(2011) *Espectrometria de Massa por Ionização por Tempo de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz para Identificação de Bactérias Clinicamente Relevantes*, Plos One. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026826/>. Acedido em: 20/07/2019
40. 16) Michael T. Madigan, et al., (2016), *Microbiologia de Brock*, Simone de fraga, 14ª Edição, 2, 203-204.
41. Fonte: [Internet], Neelja Signhal, et al., (2015), *Espetrofotometria de Massa MALDI TOF: uma Tecnologia Emergente para Identificação e Diagnostico Microbiano*, PMC, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500791/>. Acedido em: 20/07/2019.
42. Fonte: [Internet], Jacyr Pasternak, (2012), *New Methods of Microbiological Using MALDI-TOF*, Disponível em: <https://www.apps.einstein.br/revita/arquivos/PDF/2336-118-119-port-pdf>. Acessado aos: 25/07/2019.
43. Fonte: [Internet], Disponível em: <https://www.beckmancoulter.com/en/produts/microbiology/microscanwalkaway>. Acessado aos: 10/08/2019
44. Fonte: [Internet], Melissa Hernández-Durán, et al.,(2017), *Comparison of the microscan walkaway and vitek2 compact sistema of the identificacion and*

Gram.negative bacteria, v6. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=74816>. Acessado em: 10/08/2019

45. Eigner U. Et al., (2005), *Análise de fluxo de trabalho comparativo e das características de desempenho dos sistemas Vitek2 e phoenix*, *Jornal of Clinical Microbiology*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1233988/>.